外源蛋白酶对肉鸡饲粮体外降解效率的影响

王　雄[1]　唐小懿[1]　陈凤鸣[1,2]　陈清华[1*]

（1.湖南农业大学动物科学技术学院，长沙 410128；2.湖南领道农业环保科技有限公司，长沙 410128)

摘　要：本试验旨在研究外源蛋白酶对肉鸡饲粮体外降解效率的影响，并确定蛋白酶的最适添加量，为快速评价蛋白酶有效性提供理论参考。试验采用单因素完全随机设计，在肉鸡前期（1~21 日龄）和后期（22~42 日龄）基础饲粮中分别添加 0、100、200、400 和 800 mg/kg 外源蛋白酶，通过单胃动物仿生消化系统（SDS-III）建立肉鸡体外模拟消化模型测定体外降解效率。每个处理 5 个重复，每个重复 1 根仿生消化管。结果表明：肉鸡前期饲粮中添加蛋白酶能显著提高饲粮总能消化率（GED）和酶水解物能值（EHGE）（$P<0.05$），200 mg/kg 蛋白酶组的干物质消化率（DMD）显著高于对照组（$P<0.05$），且肉鸡前期饲粮 DMD、GED 和 EHGE 与外源蛋白酶添加量呈显著先升高后降低的二次线性关系（$P<0.05$）；肉鸡后期饲粮中添加蛋白酶能显著提高饲粮 DMD、GED 和 EHGE（$P<0.05$），且三者与外源蛋白酶添加量呈显著先升高后降低的二次线性关系（$P<0.05$）。由此可见，玉米－豆粕型基础饲粮中添加适量外源蛋白酶，可显著提高肉鸡饲粮体外降解效率；在本试验中，200 mg/kg 蛋白酶组体外降解效率最高。

关键词：外源蛋白酶；干物质消化率；总能消化率；酶水解物能值

中图分类号：S816　　文献标识码：A　　文章编号：

外源蛋白酶具有改善畜禽生长性能、提高饲粮蛋白质消化利用率等功能[1]，但其功能的发挥不仅取决于自身的酶学特性，还与目标动物及基础饲粮组成紧密相关。用动物试验法评定外源蛋白酶有效性复杂、耗时，因此，寻求一种简单、快速的体外法用来评定外源蛋白酶的有效性已成为饲料生产和养殖业的迫切需求。体外法分为外源酶法、内源酶法和仿生消化酶法 3 种[2]。外源酶法的代表是 Boisen 等[3]建立的胃蛋白酶–胰液素法，前人研究表明外源酶法能快速评定外源酶有效性，可作为动物试验的预试验，但也存在精确性较差、结果不稳定等缺点[4-6]。内源酶法所用消化酶稳定性差，试验结果可比性差，基本退出体外评定体系[2]。

收稿日期：2018–02–05

基金项目：长沙市科技计划项目——畜禽养殖粪污一体化处理技术研究与推广示范项目（kh1703120）

作者简介：王　雄（1991—），男，湖南长沙人，硕士研究生，从事饲料资源开发与利用的研究。E-mail: 188735129@qq.com

*通信作者：陈清华，教授，博士生导师，E-mail: chqh314@163.com

而仿生消化酶法对畜禽消化生理的模拟程度更高，对畜禽饲粮具有很好的生物学效价，可利用仿生法筛选畜禽饲粮的最佳酶谱及酶添加量[7-8]。但利用仿生法评定外源蛋白酶有效性的研究较少。因此，本试验通过单胃动物仿生消化系统建立肉鸡体外模拟消化模型，研究外源蛋白酶对肉鸡饲粮体外降解效率的影响，确定蛋白酶最适添加量，为快速评价蛋白酶的有效性提供方法参考，并为其在肉鸡中的应用提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

外源蛋白酶：由山东隆科特酶制剂有限公司提供，实测含 11 464 U/g 酸性蛋白酶、25 635 U/g 中性蛋白酶和 21 655 U/g 碱性蛋白酶。酶活定义：在特定 pH（pH=3.0、pH=7.5 和 pH=10.5），40 ℃条件下，每分钟水解酪素产生 1 μg 酪氨酸所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。

1.2　试验饲粮及试验设计

试验饲粮参照 NY/T 33—2004《黄羽肉鸡饲养标准》[9]和 NRC（1994）肉鸡营养需要[10]标准配制。基础饲粮组成及营养水平见表 1。试验采用单因素完全随机设计，对照组为肉鸡基础饲粮[分前期（1~21 日龄）和后期（22~42 日龄）]，试验组分别在肉鸡前期和后期基础饲粮中添加 100、200、400 和 800 mg/kg 的外源蛋白酶，试验共 10 种饲粮样品，每种饲粮样品设 5 个重复，每个重复 1 根仿生消化管。饲粮采用四分法取样后，用小型饲料粉碎机粉碎过 60 目筛，充分混合均匀后－20 ℃储存备用。

表 1　基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diets (air-dry basis)　　　%

项目 Items	1~21 日龄 1 to 21 days of age	22~42 日龄 22 to 42 days of age
原料 Ingredients		
玉米 Corn	53.84	59.14
豆粕 Soybean meal	32.40	27.50
棉籽粕 Cottonseed meal	3.00	3.00
菜籽粕 Rapeseed meal	2.80	2.16
豆油 Soybean oil	3.33	4.00
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	2.22	1.94
石粉 Limestone	1.03	0.97

食盐 NaCl	0.30	0.30
蛋氨酸 Met （98%）	0.18	0.12
赖氨酸 Lys （98.5%）		0.02
氯化胆碱 Choline chloride	0.20	0.15
预混料 Premix[1)]	0.70	0.70
合计 Total	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levles[2)]		
代谢能 ME/(MJ/kg)	12.12	12.54
粗蛋白质 CP	21.00	19.00
钙 Ca	1.00	0.90
总磷 TP	0.76	0.69
有效磷 AP	0.50	0.40
赖氨酸 Lys	1.08	0.98
蛋氨酸 Met	0.46	0.40
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.79	0.70

1) 预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kilogram of the diets：二氧化钛 TiO_2 5 000 mg，VA 12 000 IU，VD_3 2 500 IU，VE 20 IU，VK_3 3.2 mg，VB_1 3.0 mg，VB_2 10.0 mg，VB_6 6.0 mg，生物素 biotin 0.1 mg，泛酸 pantothenic acid 20.0 mg，叶酸 folic acid 1.25 mg，Fe 90mg，Zn 80 mg，Mn 1 000 mg，Cu 10 mg，I 0.5 mg，Se 0.15 mg。

2) 所有值为计算值。All were the calculated values.

1.3 试验方法

本试验使用单胃动物仿生消化系统（SDS-III）模拟饲粮在鸡的胃肠道的消化过程。仿生消化操作过程中透析袋的型号和前处理、胃缓冲液和小肠缓冲液的配制和仪器运行参数等参照文献[11]。

操作步骤：称取（2±0.000 2） g 饲粮样品置于装有透析袋的仿生消化管中，并加入 20 mL 已配好的胃液。将仿生消化管固定在已预热的单胃动物仿生消化系统上，连通事先配制的胃、小肠段缓冲液。胃阶段模拟消化过程（41 ℃条件下消化 4 h）结束后时，准确地将 2 mL 小肠液移入单胃动物仿生消化系统的小肠消化液储备室中，继续进行 7.5 h 的小肠前段消化和 7.5 h 的小肠后段消化。消化过程结束后，将消化残渣无损转移到已绝干恒重的培养皿中，

放在 65 ℃烘箱中烘干至无水痕后，105 ℃烘干至恒重。将培养皿中的消化残渣全部刮下，转移到已绝干恒重的玻璃砂芯坩埚中，无水乙醇脱脂（用无水乙醇冲洗残渣 3 次）后 105 ℃烘干至恒重。根据以下公式计算样品脱脂后干物质消化率、总能消化率和酶水解物能值[12]：

$$DMD(\%)=(M_1-M_2)/M_1\times100;$$

$$GED(\%)=(GE_1-GE_2)/GE_1\times100;$$

$$EHGE=(GE_1-GE_2)/(M_1\times1\ 000)。$$

式中：DMD 为饲粮体外干物质消化率（%）；GED 为饲粮体外总能消化率（%）；EHGE 为饲粮体外酶水解物能值（MJ/kg）；M_1 为上样饲粮干物质重量（g）；M_2 为未消化残渣干物质重量（g）；GE_1 为上样饲粮总能（MJ）；GE_2 为未消化残渣总能（MJ）。

1.4　数据统计分析

试验数据经Excel进行整理后，采用SPSS 19.0软件one-way ANOVA程序进行单因素方差分析，用Duncan氏法进行多重比较，并对不同蛋白酶添加量的效应进行线性和二次回归分析，结果用平均值±标准差表示，$P<0.05$为差异显著。

2　结果与分析

2.1　外源蛋白酶对肉鸡前期饲粮体外干物质消化率、总能消化率和酶水解物能值的影响

由表 2 可知，与对照组相比，200 mg/kg 蛋白酶组干物质消化率显著提高（$P<0.05$），其他加酶组干物质消化率有提高趋势（$P>0.05$），且干物质消化率与蛋白酶的添加量呈二次线性关系（$P<0.05$）。100、200 和 400 mg/kg 蛋白酶组总能消化率和酶水解物能值均显著高于对照组（$P<0.05$），总能消化率、酶水解物能值与蛋白酶的添加量呈二次线性关系（$P<0.05$）。

表 2　外源蛋白酶对肉鸡前期饲粮体外干物质消化率、总能消化率和酶水解物能值的影响

Table 2　Effects of exogenous protease on DMD, GED and EHGE *in vitro* of broiler starter diet

项目 Items	对照 Control	蛋白酶添加量 Protease supplementation levels/(mg/kg)				P 值 P-value		
		100	200	400	800	组间 Group	线性 Linear	二次 Quadratic
干物质消化率 DMD/%	70.46±0.79^b	71.81±0.33^{ab}	72.77±1.89^a	71.52±0.43^{ab}	71.39±0.18^{ab}	0.128	0.384	0.030
总能消化率 GED/%	75.09±0.27^c	76.91±0.29^{ab}	78.33±1.29^a	77.22±1.41^{ab}	75.99±0.09^{bc}	0.010	0.217	0.001

酶水解能值 EHGE/（MJ/kg）	13.84±0.05[c]	14.22±0.08[b]	14.54±0.24[a]	14.38±0.26[ab]	14.09±0.12[bc]	0.004	0.051	＜0.001

同行数据肩标不同字母表示差异显著（P＜0.05）。下表同。

Values in the same row with different letter superscripts differ significantly (P＜0.05). The same as below.

2.2 外源蛋白酶对肉鸡后期饲粮体外干物质消化率、总能消化率和酶水解物能值的影响

由表 3 可知，与对照组相比，试验组总能消化率和酶水解物能值显著提高（P＜0.05），且总能消化率、酶水解物能值与蛋白酶的添加量呈二次线性关系（P＜0.05）；肉鸡后期基础饲粮添加 100、200 和 400 mg/kg 蛋白酶后，胃肠道干物质消化率显著提高（P＜0.05），且干物质消化率与蛋白酶的添加量呈二次线性关系（P＜0.05）。

表 3　外源蛋白酶对肉鸡后期饲粮体外干物质消化率、总能消化率和酶水解物能值的影响

Table 3　Effects of exogenous protease on DMD, GED and EHGE *in vitro* of broiler finisher diet

项目 Items	对照 Control	蛋白酶添加量 Protease supplementation levels/(mg/kg)				*P* 值 *P*-value		
		100	200	400	800	组间 Group	线性 Linear	二次 Quadratic
干物质消化率 DMD/%	71.85±0.42[c]	74.32±0.18[b]	74.97±0.34[a]	74.60±0.35[b]	74.26±0.27[c]	＜0.001	＜0.001	＜0.001
总能消化率 GED/%	76.26±0.63[c]	78.29±0.14[b]	79.64±0.26[a]	78.64±0.07[ab]	77.96±0.16[b]	＜0.001	＜0.001	＜0.001
酶水解能值 EHGE/（MJ/kg）	14.33±0.12[d]	14.67±0.03[bc]	14.83±0.05[a]	14.71±0.09[b]	14.38±0.03[c]	＜0.001	0.293	＜0.001

3 讨　论

与其他体外法相比，基于单胃动物仿生消化系统的仿生法具有“标准化、仪器化、自动化”等优势，能确保试验结果的准确性和精确性[13-15]。张立兰等[12]研究表明，通过单胃动物仿生消化系统可预判外源蛋白酶的有效性，且饲粮全消化道干物质消化率及酶水解物能值和外源蛋白酶添加量具有较好的线性回归关系。本试验结果表明，外源蛋白酶可提高肉鸡玉米–豆粕型全期基础饲粮体外干物质消化率、总能消化率和酶水解物能值，且三者与蛋白酶添加量呈二次线性关系。Fru-Nji 等[16]研究发现，肉鸡玉米–豆粕型基础饲粮中添加蛋白酶可显著提高能量利用率；Stefanello 等[17]分别在肉鸡豆粕型和玉米–豆粕型半纯合饲粮中添加蛋白酶，干物质和能量的回肠末端和全消化道消化率显著提高；Angel 等[18]研究表明，在 7~22

日龄肉鸡饲粮中添加蛋白酶可提高饲粮养分的表观消化率，这都与本试验结果相符。外源蛋白酶可降低饲粮中抗营养因子，提高饲粮水解效率，从而增加其可消化性如黄明媛[19]发现蛋白酶能快速降解豆粕中抗营养因子，有效提高豆粕消化率；Lahaye 等[20]报道蛋白酶能够消除大豆中的胰蛋白酶抑制因子；Yu 等[21]采用胃蛋白酶–胰液素体外法研究表明蛋白酶可促进大豆蛋白的降解。外源蛋白酶除了降解饲粮中蛋白质和抗营养因子外，可能也影响着模拟肠消化中内源酶的活性。李慧[22]发现在肉鸡饲粮中添加 327 mg/kg 蛋白酶，有提高内源酶分泌的趋势，添加 2 619 mg/kg 蛋白酶使 1~21 日龄和 22~42 日龄肉鸡小肠食糜淀粉酶活性分别降低了 8.75%和 28.14%；周梁[23]发现添加 200 mg/kg 的蛋白酶使肉仔鸡空肠食糜的胰蛋白、糜蛋白酶活性均有显著提高；800 mg/kg 的蛋白酶添加量能显著降低胰腺的胰蛋白酶和糜蛋白酶活。本试验中，饲粮体外干物质消化率、总能消化率和酶水解物能值随着蛋白酶添加量的增加呈先升高后降低的变化，有可能是适宜外源蛋白酶添加量能提高内源酶活性，外源蛋白酶添加量过高则抑制了内源酶活性。本试验结果表明，肉鸡前期和后期基础饲粮中添加 200 mg/kg 外源蛋白酶，饲粮降解效果最好；通过单胃动物仿生消化系统可快速评定蛋白酶有效性，也为蛋白酶在肉鸡饲粮中的应用提供科学依据。

4 结 论

适量外源蛋白酶可显著提高肉鸡基础饲粮体外降解效率；本试验中，200 mg/kg 蛋白酶组体外降解效率最高。

参考文献：

[1] 王雄,陈清华.饲用蛋白酶及其在肉鸡日粮中应用的研究进展[J].饲料研究,2016(21):10–14.

[2] 艾琴,左建军,赵江涛,等.外源酶制剂评定的方法探讨[J].饲料工业,2015,36(10):16–20.

[3] BOISEN S,FERNA´NDEZ J A.Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by *in vitro* analyses[J].Animal Feed Science and Technology,1995,51(1/2):29–43.

[4] ALABI O O,ATTEH J O,ADEJUMO I O.Comparative evaluation of *in vitro* and *in vivo* nutrient digestibility of dietary levels of rice husk supplemented with or without commercial enzyme[J].International Journal of Research in Agriculture and Forestry,2015,2(6):15–19.

[5] MALATHI V,DEVEGOWDA G.*In vitro* evaluation of nonstarch polysaccharide digestibility of feed ingredients by enzymes[J].Poultry Science,2001,80(3):302–305.

[6] KONG C S,CHAN S P,KIM B G.Effects of an enzyme complex on *in vitro* dry matter digestibility of feed ingredients for pigs[J].SpringerPlus,2015,4:261.

[7] 侯小锋.非淀粉多糖酶制剂对肉仔鸡日粮能量代谢率的调控及其体外评定方法的研究[D].硕士学位论文.太谷:山西农业大学,2005.

[8] 何科林,萨仁娜,高杰,等.体外法优化肉鸡日粮非淀粉多糖酶[J].中国农业科学,2012,45(21):4457–4464.

[9] 中华人民共和国农业部.NY/T 33—2004 鸡饲养标准[S].北京:中国农业出版社,2004.

[10] NRC.Nutrient requirements of poultry[S].9th ed.Washington,D.C.:National Academy Press,1994.

[11] 赵峰,邓耀辉,张宏福,等.单胃动物仿生消化系统操作手册[M].3 版.北京:中国农业科学院畜牧研究所,2016.

[12] 张立兰,陈亮,钟儒清,等.外源蛋白酶对肉鸡饲粮体外干物质消化率和酶水解物能值的影响[J].中国农业科学,2017,50(7):1326–1333.

[13] ZHAO F,REN L Q,MI B M,et al.Developing a computer-controlled simulated digestion system to predict the concentration of metabolizable energy of feedstuffs for rooster[J].Journal of Animal Science,2014,92(4):1537–1547.

[14] ZHAO F,ZHANG L,MI B M,et al.Using a computer-controlled simulated digestion system to predict the energetic value of corn for ducks[J].Poultry Science,2014,93(6):1410–1420.

[15] CHEN L,GAO L X,HUANG Q H,et al.Prediction of digestible energy of feed ingredients for growing pigs using a computer-controlled simulated digestion system[J].Journal of Animal Science,2014,92(9):3887–3894.

[16] FRU-NJI F,KLUENTER A M,FISCHER M,et al.A feed serine protease improves broiler performance and increases protein and energy digestibility[J].The Journal of Poultry Science,2011,48(4):239–246.

[17] STEFANELLO C,VIEIRA S L,RIOS H V,et al.Energy and nutrient utilisation of broilers fed soybean meal from two different Brazilian production areas with an exogenous protease[J].Animal Feed Science and Technology,2016,221:267–273.

[18] ANGEL C R,SAYLOR W,VIEIRA S L,et al.Effects of a monocomponent protease on performance and protein utilization in 7- to 22-day-old broiler chickens[J].Poultry Science,2011,90(10):2281–2286.

[19] 黄明媛.蛋白酶对豆粕、菜粕及棉粕的酶解研究[J].饲料研究,2014(11):5–7.

[20] LAHAYE L,GAUTHIER L,熊玲玲.蛋白酶在动物生产中的应用[J].饲料与畜

牧,2011(7):41–45.

[21] YU B,WU S T,LIU C C,et al.Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance[J].Animal Feed Science and Technology,2007,134(3/4):283–294.

[22] 李慧.蛋白酶和木聚糖酶对肉鸡生长性能、消化机能及血液指标的影响[D].硕士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2010.

[23] 周梁.外源蛋白酶(ProAct)对肉鸡生产性能及氨基酸消化率影响的研究[D].硕士学位论文.北京:中国农业科学院,2014.

Effects of Exogenous Protease on *in Vitro* Degradation Efficiency of Broiler Diets

WANG Xiong[1] TANG Xiaoyi[1] CHEN Fengming[1,2] CHEN Qinghua[1*i]

(1. *College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha* 410128, *China;* 2. *Hunan Ling Dao Agriculture Environmental Protection Technology Co., Ltd, Changsha* 410128*, China*)

Abstract: The experiment was conducted to investigate the effects of exogenous protease on *in vitro* degradation efficiency of broiler diets and obtain the optimum protease supplementation in basal diets for broilers, and aiming to provide a theoretical reference for rapidly evaluating the effectiveness of protease. A single factor completely randomized design was adopted to add exogenous protease with 0, 100, 200, 400 and 800 mg/kg in basal diets for starter (1 to 21 days of age) and finisher (22 to 42 days of age) phases of broilers, respectively, and an *in vitro* simulated digestion model for broilers by using a simulated digestion system for monogastric animals (SDS-Ⅲ) was established to determine *in vitro* degradation efficiency. Each treatment contained 5 replicates with 1 digestion tube per replicate. The results showed that adding protease significantly increased the gross energy digestibility (GED) and enzymatic hydrolysate gross energy (EHGE) of basal diets for starter phases (P<0.05), and the dry matter digestibility (DMD) in 200 mg/kg protease group was significantly higher than that in the control group (P<0.05). Protease significantly increased DMD, GED and EHGE of basal diets for finisher phases (P<0.05). Moreover, there was a quadratic linear relationship between the levels of DMD, GED and EHGE and the amount of exogenous protease, and the DMD, GED and EHGE increased first and then decreased in diets for both starter and finisher phrases (P<0.05). Thus, corn-soybean meal basal diet supplemented with appropriate amount of exogenous protease can significantly improve *in*

vitro degradation efficiency of broiler diets. In this experiment, *in vitro* degradation efficiency in 200 mg/kg protease group is the highest.

Key words: exogenous protease; dry matter digestibility; gross energy digestibility; enzymatic hydrolysate gross energy

---

*Corresponding author, professor, E-mail: chqh314@163.com

（责任编辑　田艳明）